

Néhány antibiotikum készítmény inaktivációja a talajban

SZEGI JÓZSEF

MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézet,
Budapest

Igen sok kutató foglalkozott az antibiotikumok talajbeli szerepével, de az általuk kapott eredmények rendkívül eltérőek egymástól. A kutatók jelentős része Nandi [17], Gregory és munkatársai [4], Gottlieb és Siminoff [3], Hessayon [8], Grossbard [5, 6, 7], Starkey és Pramer [22], Wright [31, 32, 33], Krassilnikov [11, 12, 13], Korenjako és munkatársai [10] az általuk tanulmányozott talajokban antibiotikus anyagok jelenlétét állapították meg. Sok kutató rámutatott, hogy a különböző talajtípusokon különböző klimatikus viszonyok között nem egyformán lehet antibiotikus anyagokat kimutatni, mivel azok igen könnyen elvesztik aktivitásukat. Jefferys [9] szerint az antibiotikumok talajbeli inaktivációját a következő fontosabb tényezők határozzák meg:

1. adszorpció, 2. talaj kémhatása, 3. biológiai inaktiváció és 4. egyéb tényezők.

Már Lewis [14] rámutatott, hogy a *Bacterium fluorescens* által képzett antibiotikus anyag a talajrészecskék felületén inaktiválódni képes, és ilyen állapotban nem nyomja el a *Bacillus cereus* fejlődését, jóllehet ez a mikroba igen érzékeny a *Bacterium fluorescens* által képzett hatóanyaggal szemben. Waksmán és Woodruff [30] megfigyelései alapján az actinomyecín igen gyorsan inaktiválódik a talajban. A szerzők szerint különösen a talaj humát vegyületei hatástalanítják az actinomyecint. Thornton [29] a talaj agyagásványainak erős antibiotikum inaktiváló hatásáról számol be. Krassilnikov [13] adatai alapján 1 g neutrális kémhatású agyag 30 000 mikrogramm, 1 g savanyú kémhatású agyag pedig 60 000 mikrogramm aureomyecint képes adszorbeálni. Martin és Gottlieb [16] a cirkulin, viomycin, subtilin, neomycin és actinomyecín talajbeli adszorpcióját tanulmányozták. Adataik szerint a fenti antibiotikumok közül csak az actinomyecín maradt meg aktív állapotban a talajban, a többiek inaktiválódtak. Ugyancsak a fenti szerzők [15] a terramycin és aureomyecín talajbeli inaktivációját tanulmányozták. Megfigyeléseik szerint a savanyú kémhatású antibiotikumok jóval hosszabb ideig megőrzik aktív állapotukat, mint a bázikusak. Ezt bizonyítják Siminoff és Gottlieb [21] adatai is. Szerintük a bázikus antibiotikumok, mint pl. a streptomycin igen erősen képesek adszorbeálódni a talajrészecskék felületén, ezért az ilyen antibiotikumok a talajban gyakorlatilag nem is játszanak szerepet. Jefferys [9] szintén rámutatott a streptomycin erős talajbeli adszorpciójára, azonban szerinte a savanyú és semleges kémhatású gomba eredetű antibiotikumok kevésbé adszorbeálódnak.

A hidrogén ionok koncentrációja szintén erős hatást gyakorol az antibiotikumok talajbeli aktivitására. Krassilnikov [12], Korenjako és munkatársai [10] megállapították, hogy az antibiotikus anyagok inaktivációja jelentős mértékben függ a talaj kémhatásától. Wright [32] megfigyelte, hogy a *Trichoderma viride* által termelt gliotoxin talajbeli aktivitása a pH emelkedésével csökken. Grossbard [7] szerint a talaj kémhatása nem befolyásolja a *Penicillium notatum* nevű penészgomba antibiotikum képzésének effektivitását, azonban savanyú talajban a penicillin jóval tovább marad meg aktív állapotban.

Ugyancsak sok kutató rámutatott az antibiotikumok biológiai inaktivációjának jelentőségére a talajban. Krassilnikov [13] szerint ott, ahol bizonyos mikrobafaj antibiotikumot választ ki, az azt körülvevő egyéb mikroorganizmusok ellenanyagot képesek kitermelni. Sztrészikij [25, 26] megállapította, hogy a *Penicillium notatum* és a *Bacillus subtilis* egymás antibiotikumait kölcsönösen inaktíválni képesek. Evans és Gottlieb [1] steril és nem steril talajt beoltottak a gliotoxin nevű antibiotikumot termelő *Trichoderma viride* nevű gombával. A szerzők a gliotoxin jelenlétét csak steril talajban állapították meg. Gottlieb és Siminoff [3] kísérletei alapján az *Actinomyces venezuelae* által kiválasztott chloromycetin csak steril talajban marad aktív állapotban. Nissen [18] nem steril talajba penicillint, streptomycint, aureomycint, terramycint és chloromycetint vitt be igen magas koncentrációban. A szerző adatai alapján a chloromycetin, penicillin és terramycin igen gyorsan inaktíválódott. Az aureomycin és streptomycin megmarad aktív állapotban a kísérlet végéig. Stevenson [23, 24] steril és nem steril talajba antagonista sugárgomba törzseket vitt be. A szerző antibiotikum képződést csak steril talajban figyelt meg. Szabó és Marton [27] megállapításai szerint az *Actinomyces M/17* sugárgomba-törzs csak steril talajban képez kimutatható mennyiségben antibiotikumot.

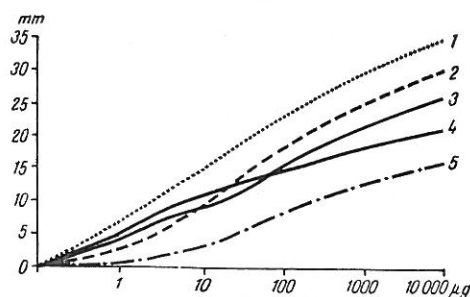
Az antibiotikumok aktivitására ezeken kívül még egyéb tényezők is hathatnak a talajban. Jefferys [9] megállapításai szerint az antibiotikumok kémiai úton reagálni képesek a talajban levő vegyületekkel és elemekkel, illetőleg azok katalizátorként is befolyásolhatják az antibiotikumok inaktivációját. Szideri [28] szerint egyes elemek, mint pl. Zn, Co, Fe, Cd és mások gátolhatják vagy serkenthetik a toxinok inaktivációját a talajban. Ezenkívül befolyásolja az inaktivációt a talaj hőmérséklete és nem utolsósorban magának az antibiotikumnak a kémiai felépítése is. Krassilnikov [13] megfigyelései alapján ugyanaz az antibiotikum különböző talajokban különböző gyorsasággal inaktíválódik. A szerző szerint a globisporin podzol talajban 7 napig, a vörösföldben 2 napig marad meg aktív állapotban. Az aureomycin podzolon 10, a vörösföldben 3 nap múltán veszti el aktivitását.

Kísérleti rész

A kísérlet folyamán öt antibiotikum készítményt használtam fel: a streptomycin magyar eredetű volt, az aureomycin és penicillin a Szovjetunióban, a terramycin és viomycin pedig az Amerikai Egyesült Államokban készült. Test-mikrobaként az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs szolgált, melyet a Moszkvai Timirjazev Mezőgazdasági Akadémia Mikrobiológiai Tanszékének kollekcijából M. V. Fjodorov professzor bocsátott rendelkezésemre.

Először azt vizsgáltam meg, hogy a kísérletbe vont 5 antibiotikum készítménynek különböző dózisaiban milyen fokban gátolják az *Azotobacter* fejlődését. A por alakú antibiotikum preparátumokat tartalmazó üveg-fiolákba meghatározott mennyiségű steril desztillált vizet pipettáztam be. Miután az antibiotikumok a fiolákban feloldódtak, steril desztillált vizet tartalmazó kémcsövekben különböző hígításokat készítettem. Ezután az *Azotobacter*-rel előzőleg beoltott agarlemezbe 7 mm átmérőjű lyukakat vágtam, majd steril pipetták segítségével 1/10 ml antibiotikum oldatot pipettáztam be. Az agarlemezek M. V. Fjodorov [2] által módosított nitrogénmentes táptalajt tartalmaztak. A Petri-csészéket 24 órán át termosztátban inkubáltam, majd megmértem az egyes antibiotikum készítmények és különböző antibiotikum dózisosok által az *Azotobacter*-rel szemben képzett gátlózóna átmérőjét. A kapott eredményeket az 1. ábra mutatja.

Amint az ábrából látható, az egyes antibiotikumok nem egyforma hatékonysággal nyomják el az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs fejlődését. Legerősebb antibiotikus hatást a penicillin fejtett ki, utána következett az aureomycin és terramycin, majd a streptomycin, s végül leggyengébben hatott a viomycin.



1. ábra

Antibiotikumok hatása az *Azotobacter chroococcum* fejlődésére 1. Penicillin. 2. Aureomycin. 3. Terramycin. 4. Streptomycin. 5. Viomycin

A továbbiakban azt tanulmányoztam, hogy a vizsgálatba vont antibiotikum készítmények talajba bevéve milyen fokban inaktíválódnak. A kísérletben a Moszkvai Timirjazev Mezőgazdasági Akadémia kísérleti terének gyepes podzol talaját használtam fel. A talaj vizes kivonatának kémhatása elektrometrikus módszerrel meghatározva pH 5,2 volt. 150 ml-es lombikokba bemértem 25—25 g talajt. A bemért talajt steril desztillált vízzel kissé megnedvesítettem egyrészt, hogy a mikrobák számára megfelelő fejlődési viszonyokat biztosítsak, másrészt, hogy a talajt könnyebben sterilizálhassam. A lombikokban levő talaj egy részét autoklávban másfél atmoszféra nyomás mellett 2 órán át sterilizáltam. Novogrudskij [19] és más kutatók rámutattak, hogy sterilizálás folyamán a talajban különféle mérgező anyagok keletkezhetnek, amelyek gátolják nemcsak a talaj mikroflórájának, hanem a magasabbrendű növényeknek a fejlődését is. Ezért ellenőriztem, hogy sterilizálás előtt és után a talajban nem halmozódtak-e fel az *Azotobacter* fejlődését gátló toxikus anyagok. Az *Azotobacter*-rel előzőleg beoltott Petri-csészében levő agarlemez felszínére helyezett talajrögöcskék körül gátlózóna nem volt.

Az ellenőrzés után a steril antibiotikum oldatokat pipetták segítségével bevitettem a steril és nem steril talajt tartalmazó lombikokba. A lombikok egy részét 30 napon át szobahőmérsékleten tartottam. Közben az elpárolgott víz pótlására időnként steril vizet pipettáztam be a lombikokba. A lombikok másik részénél a talajba vitel után azonnal meghatároztam az antibiotikumok aktivitását. Ezzel a meghatározással azt akartam megállapítani, hogy a bevitt antibiotikumok talajbeli inaktivációjánál milyen szerepük van az adszorpció

1. táblázat

Antibiotikumok megmaradása aktív állapotban a talajban

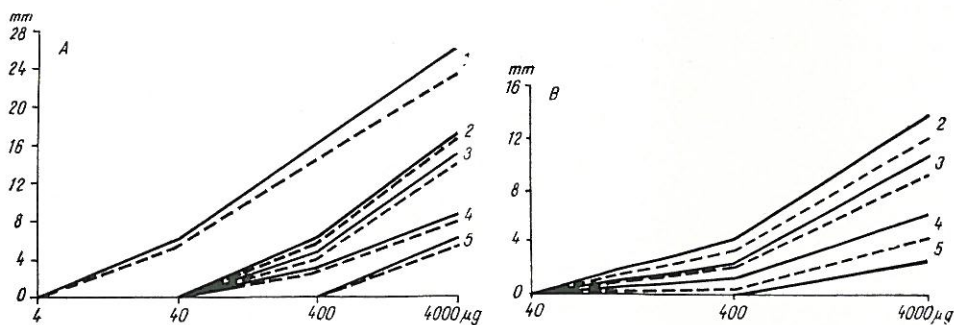
(1) Az antibiotikumok neve	100 μ g				1 000 μ g			
	(2) Bevitel után azonnal		(3) Egy hónap múlva		(2) Bevitel után azonnal		(3) Egy hónap múlva	
	steril	nem steril	steril	nem steril	steril	nem steril	steril	nem steril
talajban								
<i>Streptomycin</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Aureomycin</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Terramycin</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Viomycin</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Penicillin</i>	—	—	—	—	++	++	—	—

(1) Az antibiotikumok neve	10 000 μ g				100 000 μ g			
	(2) Bevitel után azonnal		(3) Egy hónap múlva		(2) Bevitel után azonnal		(3) Egy múlva hónap	
	steril	nem steril	steril	nem steril	steril	nem steril	steril	nem steril
talajban								
<i>Streptomycin</i>	++	++	+	+	+++	+++	+++	++
<i>Aureomycin</i>	+	+	+	—	+++	+++	++	++
<i>Terramycin</i>	++	++	+	+	+++	+++	+++	+++
<i>Viomycin</i>	—	—	—	—	+	+	+	—
<i>Penicillin</i>	+++	+++	—	—	+++	+++	—	—

—	gátlózóna nincs	} az <i>Azotobacter</i> -rel szemben a talajrögöcskék körül
+	gyenge gátlózóna	
++	közepes gátlózóna	
+++	erős gátlózóna	

és egyéb nem biotikus tényezőknek. A meghatározást kétféle módszerrel végeztem. Az egyik módszer lényege abban van, hogy a vizsgálandó talajból kivettem 1 g-ot. A talajt apró rögöcskék formájában előzőleg *Azotobacter* sejtekkel beoltott Petri-csészében levő agarlemezre osztottam szét. A csészéket 24 órán át 32 C°-os termosztátban inkubáltam. Az inkubációs idő elteltével megfigyeltem a talajrögöcskék körül képződött gátlógyűrűt (1. táblázat). Mivel a lemezre helyezett talajrögöcskék nem voltak teljesen egyforma nagyságúak, ezért az általuk képzett gátlózónák is különböztek egymástól, s így ezek alapján nem lehetett egymáshoz viszonyítani az egyes kísérleti variánsok antibiotikus aktivitását. Hogy ezt el tudjam végezni, a következő módszert alkalmaztam. A lombikokba 10—10 ml steril desztillált vizet pipettáztam be. A lombikok vattadugóit alkoholos leégetéssel sterilizált gumidugókkal cseréltem fel. Az így lezárt lombikokat rázógéphez helyeztem, és 1 órán át ráztam. Rázás után a szuszpenziót 2 órán át ülepedni hagytam, majd steril pipettával a folyadékot lepipettáztam a talaj felszínéről, és lyuk-teszt módszerrel meghatároztam az *Azotobacter*-rel szembeni antibiotikus aktivitását. A gátlózónák átmérőit a különböző antibiotikumok hatására a 2. ábrából láthatók.

A táblázatból és az ábrából látható, hogy a vizsgált gyepes podzol talaj erősen inaktíválja a fenti antibiotikumokat. 1 g talajra átszámítva 40 mikrogramm penicillin, 400 mikrogramm aureomycin, terramycin, streptomycin, valamint 4 000 mikrogramm viomycin jelenlétében lehet megfigyelni az *Azotobacter* sejtek szaporodásának gátlását.



2. ábra

Antibiotikumok aktivitása a talajban. A) A bevitel után azonnal és B) 30 nap múlva. — steril talaj, — — — nem steril talaj. 1. Penicillin. 2. Terramycin. 3. Aureomycin. 4. Streptomycin. 5. Viomycin

A továbbiakban ugyancsak a fenti módszerekkel határoztam meg annak a talajnak az antibiotikus aktivitását, melyet 1 hónapon át szobahőmérsékleten tartottam az antibiotikum bevétele után. Itt főleg azt akartam megtudni, hogy a biológiai tényezők hatására milyen fokú inaktiváció megy végbe az antibiotikumoknál. A kísérlet eredményeit a 2/B ábra mutatja.

Az ábrából látható, hogy szobahőmérsékleten egy hónap elteltével a különböző antibiotikumok nem egyformán inaktíválódnak a vizsgált gyepes podzol talajban. A penicillin mind a steril, mind pedig a nem steril talajt tartalmazó lombikokban 30 nap leforgása alatt teljesen elvesztette aktivitását. Az aureomycin, terramycin és streptomycin viszonylag kevésbé inaktíválódnak. Ezen három antibiotikum aktivitása steril és nem steril talajban csak igen kevésbé különbözik egymástól. Más a helyzet a viomycinnél. Ez az antibiotikum, amely egyébként is gyenge aktivitást fejt ki az *Azotobacter*-rel szemben, a talajban nem steril viszonyok között egy hónap elteltével teljesen elvesztette aktivitását.

Eredmények megbeszélése

Az adatokból látható, hogy az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs igen érzékenynek mutatkozik a kísérletben felhasznált antibiotikumokkal szemben, jóllehet a különböző antibiotikumok nem egyformán gátolják annak szaporodását. Az *Azotobacter*-nek az antibiotikumokkal szembeni nagy érzékenységét figyelte meg R u s c h m a n n [20] is, aki feltételezi, hogy az *Azotobacter* nyálkás tokja képes adszorbeálni az antibiotikumokat.

A Moszkvai Timirjazev Mezőgazdasági Akadémia kísérleti területének gyepes podzol talaja igen erősen inaktíválja az antibiotikus anyagokat. Míg vizes oldatban a streptomycin, aureomycin, penicillin, terramycin már 1 mikrogramm/ml jelenlétében, a viomycin 10 mikrogramm/ml jelenlétében, gátolja

az *Azotobacter* szaporodását, addig 1 g talajban a penicillin esetében 40 mikrogramm, a streptomycinnél, terramycinnél és aureomycinnél 400 mikrogramm, a viomycin esetében pedig 4000 mikrogramm váltja ki ezt a hatást. Egy hónap elteltével a fenti antibiotikumok közül csak a penicillin veszítette el teljesen aktivitását, mind a steril, mind a nem steril talajt tartalmazó lombikokban. Mivel az inaktiváció a steril talajban is végbement, fel lehetett tételezni, hogy a hatástalanításnál fontos szerepet vittek a különböző abiotikus tényezők. Ezt bizonyítja az a tény is, hogy a streptomycint, aureomycint és terramycint tartalmazó talajok esetében 30 nap eltelte után az antibiotikumok aktivitása között nincsenek nagy különbségek. Jóllehet a steril és nem steril viszonyok közötti antibiotikumok aktivitását ábrázoló két görbe nem esik teljesen egybe, azonban a közöttük levő csekély eltérés arra enged következtetni, hogy a bevitt antibiotikumok talajbeli inaktivációjában az adott talajtípus esetében, nem a biológiai tényezőknek van elsőrendű jelentőségük, hanem a szerves talajkolloidok adszorpciójának, a talajvegyületek és az antibiotikumok kölcsönhatásának, a hőmérsékletnek és egyéb abiotikus tényezőknek.

Sok kutató abból kiindulva, hogy egyes antibiotikumok a talajban csak magasabb koncentrációkban mutathatók ki, mint vizes oldatban, azt a következtetést vonták le, hogy azoknak a talajban gyakorlatilag nincs semmiféle szerepük. Jelen dolgozatban nincsen hely arra, hogy belemenjünk ennek a kérdésnek a részletes tárgyalásába, azonban meg kell mondani, hogy az antibiotikumok szerepének és jelentőségének elfogadható magyarázatát egyedül a micsurini biológia adja, amely az antibiotikumokat nem véletlen anyagszere termékként szemléli, hanem annak a hosszú és bonyolult evolúciónak az alapján, melyen az idők folyamán a létért folytatott állandó küzdelemben az antibiotikumot termelő mikroorganizmus végig ment. A micsurini biológia az antibiotikumokat az antagonista mikroorganizmusok fegyverének tartja a konkurens mikr. obafajokkal szemben aléért folytatott küzdelemben. Talajba helyezett Cholodny-lemezek segítségével könnyű megállapítani, hogy a mikroorganizmusok különböző fajai nem egyenlően szétoszolva találhatók a talajban, hanem mikroszkópikus góccokat képeznek. K r a s s i l n i k o v [11] és más kutatók megállapításai szerint a góccokba tömörült mikroba csoportoknak egyik igen fontos feladata: védekezés a konkurens fajokkal szemben. Krassilnikov nem tagadja, hogy a mikroba góccokból kidiffundáló antibiotikus anyagok a biotikus tényezők hatására vagy kölcsönhatásba lépve a talaj vegyületeivel inaktíválódhatnak, jóllehet sok esetben aktív állapotban is kimutathatók, azonban a góccokon belül az antibiotikumok mindig aktív állapotban találhatók meg. Sajnos módszereink még eléggé kezdetlegesek ahhoz, hogy a talajban a különböző mikroba fajok közötti kölcsönviszonyt pontosan nyomon tudnánk követni. Ebben az irányban a jövőben a kísérleteket feltétlenül folytatni kell.

Összefoglalás

A kísérletben felhasznált streptomycin, aureomycin, terramycin, viomycin és penicillin lyukteszt módszerrel vizsgálva, különböző effektivitással gátolják az *Azotobacter chroococcum* 53-as törzs fejlődését.

A fenti antibiotikumok a Timirjazev Mezőgazdasági Akadémia gypes podzol talajába bevive erősen inaktíválódnak.

Valószínű, hogy az adott talajban az abiotikus tényezőknek van elsőrendű szerepük az inaktivációnál, mivel az antibiotikumok aktivitása a steril és nem steril talajban csak gyengén különbözik egymástól, jóllehet a talaj egy hónapon át szobahőmérsékleten volt.

Érkezett: 1959. június 12.

Irodalom

- [1] Evans, E. & Gottlieb, D. : The role of gliotoxin in the soil. *Phytopath.* **42**. 465. 1952.
- [2] Fjodorov, M. V. : Rukovodstvo k prakticeszkim zanjatijam po mikrobiologii. Széljhozgiz. Moszkva. 1957.
- [3] Gottlieb, D. & Siminoff, P. : The production and role of antibiotics in the soil. II. Chloromycetin. *Phytopath.* **42**. 21. 1952.
- [4] Gregory, K., Allen, O., Riker, A. & Peterson, W. : Antibiotic agents for the control of certain damping of fungi. *Amer. J. Bot.* **6**. 405. 1952.
- [5] Grossbard, E. : Production of antibiotic substance on wheatstraw and other organic materials and in the soil. *Nature*. **161**. 614. 1948.
- [6] Grossbard, E. : Antibiotic production by fungi on organic manures and in soil. *J. Gen. Microbiol.* **6**. 295. 1952.
- [7] Grossbard, E. : Factors influencing antibiotic production in the soil. *Rap. et comm. Huitième congr. internat. bot. Paris*. 68. 1954.
- [8] Hessayon, D. : Fungitoxin in soil. *Soil Sci.* **74**. 395. 1953.
- [9] Jefferys, E. G. : The stability of antibiotics in soils. *J. Gen. Microbiol.* **7**. 295. 1952.
- [10] Korenjako, A. I., Artamonova, O. I. & Letunova, Sz. V. : Obrazoványie i szohranényie antibioticseszkizh vescsesztv v pocve. *Mikrobiologija*. **42**. 550—557. 1955.
- [11] Krassilnikov, N. A. : Aktinomiceti antagonishti, i antibioticseszkizh vescsesztva. *Izd. A. N. SSSR. Moszkva—Leningrad*. 1950.
- [12] Krassilnikov, N. A. : Mikroorganizmi i plodorodie pocvi. *Izv. A. N. SSSR. Szer. Biol.* **2**. 14. 1954.
- [13] Krassilnikov, N. A. : Mikroorganizmü pocvi i vüszsie rasztényija. *Izd. A. N. SSSR. Moszkva*. 1958.
- [14] Lewis, J. : Bacterial antagonisms with special reference to the role of *Pseudomonas fluorescens* on sporaforming bacteria in soils. *J. Bacter.* **17**. 89. 1929.
- [15] Martin, M. & Gottlieb, D. : The production and role of antibiotics in the soils. III. Terramycin and aureomycin. *Phytopath.* **41**. 420. 1951.
- [16] Martin, M. & Gottlieb, D. : The production and role of antibiotics in the soil. V. Antibacterial activity of five antibiotics in soil. *Phytopath.* **45**. 407. 1955.
- [17] Nandi, P. N. : The influence of antibiotics on microorganisms in soil. Ph. D. Thesis University of London. 1948.
- [18] Nissen, T. : Effect of antibiotics on carbondioxide production in soil. *Nature*. **174**. 226—227. 1954.
- [19] Novogrudszkij, D. : Pocsvennaja mikrobiologija. *Izd. A. N. Kazahszkoj SSR. Alma Ata*. 1956.
- [20] Ruschmann, G. : Über Antibiosen und Symbiosen von Bodenorganismen, ihre Bedeutung für die Bodenfruchtbarkeit. II. Azotobacter Symbiosen und Antibiosen. *Z. PflErnähr. Düng.* **58**. 1952.
- [21] Siminoff, P. & Gottlieb, D. : The production and role of antibiotics in the soil. III. The fate of streptomycin. *Phytopath.* **41**. 420. 1951.
- [22] Starkey, R. & Pramer, D. : The significance of streptomycin in soil. *Abst. Comm. 6-th Inter. Congr. Microbiol Rome*. **3**. 145. 1953.
- [23] Stevenson, J. L. : Antibiotic Production of Actinomyces in soil and their effect on rootrot of wheat. *Rapp. et comm. Huitième Congr. Internat. Bot. Paris*. 21—27. 1954.
- [24] Stevenson, J. L. : Antibiotic production by Actinomycetes in Soil demonstrated by Morphological Changes induced in *Helminthosporium sativum*. *Nature*. **174**. 598—599. 1954.
- [25] Sztresinszkij, M. O. : Sztimulirujuscsee gyejsztvie penicillina na obrazoványije biologiczeszkizh aktivnih vescsesztv kulturoj Bac. subtilis. *Mikrobiologija*. **18**. 5. 1949.
- [26] Sztresinszkij, M. O. : Rol antibioticseszkizh vescsesztv v antagoniszticseszkizh vzaimootnosényijáh mezsdü *Penicillium notatum* i *Bacillus subtilis*. *Trudi Insztituta Genetiki*. **17**. 96. 1950.

- [27] Szabó I. & Marton M.: A sugárgombák kölcsönös antagonizmusa. *Agrokémia és Talajtan*. **4**. 237—250. 1955.
- [28] Szideri, I. D.: K biológiai rozlosztényija organicseszko go vcseszstva v pocsvc. *Agrobiológija*. **1**. 78. 1950.
- [29] Thornton, H. G.: Soil microbiology department. Rothamsted Exp. Station. Harpenden. Report for 1951. 55—62. 1952.
- [30] Waksman, S. A. & Woodruff, H. B.: The occurrence of bacteriostatic and bactericidal substances in the soil. *Soil Sci.* **53**. 232. 1942.
- [31] Wright, J. M.: The production of antibiotics in soil. I. Production of gliotoxin by *Trichoderma viride*. *Ann. Appl. Biol.* **41**. 280. 1954.
- [32] Wright, J. M.: The production of antibiotics in soil. III. Production of gliotoxin in wheatstraw buried in soil. *Ann. Appl. Biol.* **44**. 461—466. 1956.
- [33] Wright, J. M.: Production of gliotoxin in soils. *Nature*. **177**. 896. 1956.

ИНАКТИВАЦИЯ НЕКОТОРЫХ АНТИБИОТИКОВ В ПОЧВЕ

И. Сеги

Научно-Исследовательский Институт Почвоведения и Агрохимии АН Венгрии, Будапешт

Резюме

В начале нашего опыта нами была изучена эффективность торможения водных растворов разных антибиотиков на развитие *Azotobacter chroococcum* штамма 53 по методу «луночного теста». В течение опыта мы использовали следующие антибиотики: стрептомицин, ауреомицин, тетраамицин, виомицин и пенициллин. Из стерильных растворов вышеуказанных антибиотиков были приготовлены разные разведения. При помощи пробочного сверла, стерилизованного в спирте, в агаровой пластинке, ранее зараженной азотобактером, были сделаны отверстия диаметром 7 мм. В каждое отверстие добавлялось 1/10 мл жидкости, содержащей антибиотические вещества. Агаровые пластинки содержали безазотную питательную среду в модификации М. В. Федорова. Чашки Петри ставились в термостат на 24 часа. После инкубации были определены диаметры зоны торможения роста азотобактера.

На графике видно, что разные антибиотики подавляют развитие азотобактера разной эффективностью. Наиболее сильное торможение оказывает пенициллин, потом ауреомицин, тетраамицин и стрептомицин, наиболее слабое влияние вызывает виомицин.

В дальнейшем мы хотели установить, в какой степени и под влиянием каких факторов инактивируются данные антибиотики, добавленные в почву.

Из дерно-подзолистой почвы опытной станции Московской ордена Ленина сельскохозяйственной академии им. К. А. Тимирязева было добавлено 25 г. в колбы Эрленмейера. Почва увлажнялась стерильной дистиллированной водой. Это делалось потому, что мокрая почва гораздо легче стерилизуется в автоклаве, чем сухая. Кроме этого, добавлением воды создали лучшие условия для развития почвенных микроорганизмов. Половина колб, содержащих почву, была простерилизована в автоклаве при давлении пара 1,5 атмосферы в течение двух часов. После стерилизации мы проверили не накопились ли во время нагревания токсические вещества, подавляющие развитие азотобактера. Комочки стерильной почвы, расположенные на поверхности агаровой пластинки, ранее зараженной азотобактером, не вызывали зону угнетения данного микроорганизма. После стерилизации в колбы были добавлены разные дозы вышеуказанных антибиотиков.

В половине колб, содержащих стерильную и нестерильную почву, определялась антибиотическая активность добавленных антибиотиков сейчас же после их добавления. Остальные колбы были оставлены при комнатной температуре в течение суток. Когда почва начинала подсушиваться, при помощи стерильной пипетки добавлялось определенное количество стерильной воды. После инкубации определялась степень инактивации антибиотиков.

Антибиотическую активность почвы мы проверяли двумя методами. Сущность первого метода состоит в том, что из испытуемой почвы было взято 1 г. Эта почва в виде

комочков наносилась на поверхность синтетической безазотной среды в чашку Петри, предварительно зараженной азотобактером. После 24-часовой инкубации мы наблюдали зоны торможения антибиотиков к азотобактеру вокруг комочков почвы (таблица № 1, график № 2). Так как размеры почвенных комочков не являются одинаковыми, поэтому размеры зон торможения азотобактера также отличаются друг от друга. Чтобы можно было сравнивать разные варианты опыта друг с другом, необходимо было использовать и другой метод. В каждую колбу мы добавляли 10 мл стерильной дистиллированной воды. Колбы закрывали стерильными каучуковыми пробками и ставили их в качалку. Встряхивание почвенной болтушки проводилось в течение одного часа. Через шесть часов после взбалтывания, когда почва осела, с поверхности осевшей почвы при помощи стерильной пипетки брали воду и по методу «луночного теста» определили антибиотическую активность водной болтушки. Результаты опыта видны из графиков № 2 и № 3.

Графики показывают, что дерно-подзолистая почва опытной станции ТСХА сильно инактивирует добавленные антибиотические вещества. В водном растворе стрептомицин, ауреомицин, тетраамицин и пенициллин в присутствии 1-ого мг/мл, а виомицин в присутствии 10 мг/мл подавляют размножение азотобактера по методу луночного теста. По методу разложения комочков на агаровой пластинке, каждый грамм почвы должен иметь 40 мг пенициллина, 40 мг ауреомицина, тетраамицина, стрептомицина, а также 4000 мг виомицина, чтобы оказывать антибиотические действия на азотобактер. Среди вышеуказанных антибиотиков, через месяц только пенициллин потерял полностью свою активность в колбах, содержащих как стерильную, так и нестерильную почву. В результате того, что инактивация пенициллина в колбах, содержащих стерильную почву также происходила, можно предполагать, что его инактивация идет главным образом под влиянием разных абиотических факторов. Среди стерильных и нестерильных колб, содержащих стрептомицин, тетраамицин и ауреомицин через 30 дней нет большой разницы. Хотя кривые стерильных и нестерильных вариантов опыта на графике не совпадают, однако среди них можно наблюдать только незначительную разницу. На основе этого факта можно сделать такой вывод, что при инактивации исследуемых антибиотиков первостепенное значение имеют не биологические факторы, а их адсорбция неорганическими и органическими коллоидами почвы, взаимодействие между почвенными соединениями и антибиотиками, а также другие абиотические факторы.

Рис. 1. Влияние антибиотиков на развитие *Azotobacter chroococcum* 1. пенициллин, 2. ауреомицин, 3. тетраамицин, 4. стрептомицин, 5. виомицин.

Рис. 2. Активность антибиотиков в почве. А) сразу после добавления, В) через 30 дней, — — — стерильная почва, - - - - - нестерильная почва. Вертикальная ось: размер зон торможения. Горизонтальная ось: количество антибиотиков в мг-ах.

Табл. 1. Сохранение антибиотиков в активном состоянии в стерильной и нестерильной почве. Количество антибиотиков, добавленных в почву 100—100 000 мг. (1) Название антибиотиков. Время определения. (2) Сразу после добавления. (3) Через 1 месяц — зоны торможения нет, + слабая, ++ средняя, +++ сильная зона торможения, против *Azotobacter* вокруг комочков почвы.

The Inactivation of Some Antibiotics in Soil

J. SZEGI

Research Institute of Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Summary

In the first part of the reported experiments the activity of aqueous solutions of some antibiotics on *Azotobacter chroococcum* strain 53 was studied with the hole-test method. Aqueous solutions of streptomycin, aureomycin, terramycin, viomycin, and penicillin were applied at different concentrations made up with sterile distilled water. Holes with a diameter of 7 mm were made in the agar plates with a cork-borer, sterilized by alcoholic cauterization. 0.1 ml of each solution containing various antibiotics was poured into the holes surrounded by the actively growing culture of *A. chroococcum*. The Petri dishes were incubated for 24 hours after which the diameters of the inhibition zones were measured (Fig. 1.). The agar plate in these experiments contained a N-free nutrient modified by M. V. Fedorov.

Fig. 1. shows great differences in the inhibitory effects of the antibiotics studied. Greatest inhibition was observed with penicillin, followed by aureomycin and terramycin. Streptomycin was even less effective, and viomycin was the least effective of the antibiotics studied.

The subsequent experiments were designed for the investigation of the mode and extent of inactivation of the above antibiotics if applied to soils.

25–25 g of the turfy podsol soil of the Timiryazev Academy for Agriculture, Moscow, was weighed into 150 ml Erlenmeyer flasks. The soil was moistened with sterile distilled water to create optimal conditions for the growth of microorganisms, and to facilitate at the same time the sterilization of the soil. Half of the flasks were namely sterilized by autoclaving for 1 hour at 1.5 atm pressure in the autoclave. It has been ascertained that toxic substances, inhibiting the growth of *Azotobacter*, were not produced by autoclaving the soil (sterilized soil granules were not surrounded by inhibition zones on agar plates inoculated with *A. chroococcum*). Various doses of the antibiotics studied were thereafter supplied into the flasks.

The antibiotic activity of the sterilized and non-sterilized soils was determined in some of the flasks immediately after mixing in the various antibiotics. The remaining flasks were incubated for 30 days at room temperature, during which period the water evaporated has been occasionally supplemented. Antibiotic activity was determined in the second group after incubation.

Two methods have been applied for the determination of antibiotic activity. The first of these might be briefly outlined as follows: 1 g of the soil in question was put on the surface of an agar plate inoculated with *Azotobacter*, and the diameter of the inhibition zone was measured after incubation for 24 hours (Table 1.). But since the soil granules used were of different sizes, the surrounding inhibition zones were also different. A second procedure was therefore tried: The Erlenmeyer flasks were supplied with 10 ml distilled water. The cotton plugs were replaced by sterile rubber stoppers, and the soils were shaken for 1 hour. The soil suspensions were allowed to stand for an additional period of 6 hours to obtain a clear supernatant, and the clear solution was used in the hole-test method. Results are given in Fig. 2.

The data presented show that the turfy podsol soil used in our investigations is able to inactivate to a great extent the antibiotics studied. Whereas streptomycin, aureomycin, terramycin and penicillin are effective in an amount of 1 $\mu\text{g/ml}$, and even viomycin is inhibitory at 10 $\mu\text{g/ml}$, the lowest effective amounts in 1 g soil are 40 μg with penicillin, 400 μg with aureomycin, terramycin and streptomycin, and as much as 4000 μg with viomycin. A complete loss of activity during a 30-day incubation period was only observed with penicillin, regardless of whether the soil was or was not autoclaved. It is suggested, therefore, that the inactivation of penicillin was mainly due to abiotic factors in the experiments described. The same conclusion might also be drawn in respect to the inactivation of streptomycin, terramycin, and aureomycin, since the differences between the recovered activities in the corresponding autoclaved and non-autoclaved soils seem to be insignificant. It is suggested, that incubation for 30 days of the above antibiotics results in their partial inactivation at the first place because of the action of abiotic factors, such as adsorption on organic and inorganic soil colloids, chemical reactions between the antibiotics and certain chemical components of the soil, etc.

Captions

Fig. 1. The inhibitory effect of some antibiotics on *Azotobacter chroococcum* in the hole-test. 1. Penicillin. 2. Aureomycin. 3. Terramycin. 4. Streptomycin. 5. Viomycin

Fig. 2. The inactivation of some antibiotics in soil (water extracts). A) The inhibitory effect immediately after mixing into the soil. B) The inhibitory effect after incubation for 30 days. — Autoclaved soil, - - - - soil not autoclaved. Abse: antibiotic, μg . Ord: diameter of the inhibitory zone, mm.

Table 1. The inactivation of some antibiotics in soil (soil granules). (1) Antibiotic. (2) Measured immediately after adding the antibiotic to the soil, and (3) measured after incubation for 30 days. — zone of inhibition is absent, + weak, ++ medium, +++ strong zone of inhibition of *Azotobacter* surrounding the soil granule